

MODULARIO
I.C.A. - 101

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

REC'D 18 SEP 2000

WIPO

PCT

EPO - DG 1

11. 09. 2000



10/048038

(70)

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. F099 A 000015

EP 00/07022

4

*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
 risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

Roma, il 17 AGO. 2000

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Ing. R. Mazzoni

Riccardo Mazzoni

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO 4



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione VERDINI ANTONIO
Residenza VIALE G. MARCONI, 29 CASTROCARO TERME codice VRDNTN4OB17E328D
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome _____ cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza _____
via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario VERDINI ANTONIO

via VIA G. MARCONI n. 29 città CASTROCARO TERME cap 47011 (prov) FO

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) _____ gruppo/sottogruppo _____

"DENDRIMERI POLIPEPTIDICI QUALI TRASPORTATORI UNIMOLECOLARI DI FARMACI E SOSTANZE BIOLOGICAMENTE ATTIVE"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome _____

cognome nome _____

1) _____ 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOLGIMENTO RISERVE
Data _____ N° Protocollo _____

1) NESSUNA _____ 2) _____

_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) <input type="checkbox"/>	<u>PROV</u>	n. pag. <u>45</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) <input checked="" type="checkbox"/>	<u>PROV</u>	n. tav. <u>00</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) <input type="checkbox"/>	<u>RIS</u>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4) <input type="checkbox"/>	<u>RIS</u>		designazione inventore
Doc. 5) <input type="checkbox"/>	<u>RIS</u>		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) <input type="checkbox"/>	<u>RIS</u>		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) <input type="checkbox"/>			nominativo completo del richiedente

SCIOLGIMENTO RISERVE
Data _____ N° Protocollo _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
confronta singole priorità
_____ / _____ / _____

8) attestati di versamento, totale lire CINQUECENTOSESSANTACINQUEMILA obbligatorio

COMPILATO IL 12/31/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) VERDINI ANTONIO

CONTINUA SI/NO NO

Antonio Verdini

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

FORLI'

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA FO99A000015

Reg. A.

codice 40

L'anno millenovectento NOVANTANOVE



IL DEPOSITANTE

VERDINI ANTONIO Anton. Verdini

L'Ufficiale Rogante
M. Dradi

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

N. EPO COMPLICA:

FO99A00001

REG. A

DATA DI DEPO.

23/07/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCI

11/11/11

C. TITOLO

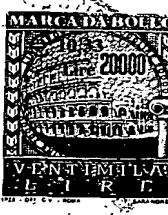
"DENDRIMERI POLIPEPTIDICI QUALI TRASPORTATORI UNIMOLECOLARI DI FARMACI E SOSTANZE BIOLOGICAMENTE ATTIVE"

L. RIASSUNTO

VENGONO DESCRITTI DENDRIMERI POLIPEPTIDICI DI SINTESI LA CUI STRUTTURA E' COMPOSTA DA UN NUCLEO CENTRALE POLIFUNZIONALE DA CUI SI IRRADIANO CATENE POLIPEPTIDICHE RAMIFICATE AD ALBERO, CIASCUNA DELLE QUALI DERIVANTE DALLA CONDENSAZIONE A CASCATA DI PEPTIDI CORTI CONTENENTI UN CENTRO DI RAMIFICAZIONE. TRE SEGMENTI LINEARI, ALMENO DUE DEI QUALI DI LUNGHEZZA PRESSOCHE' IDENTICA, SI DIPARTONO A LORO VOLTA DA CIASCUN CENTRO DI RAMIFICAZIONE. I CANALI E LE CAVITA' INTERNE DEI DENDRIMERI OSPITANO MOLECOLE DI FARMACI O SOSTANZE BIOATTIVE, IL CUI RILASCI

Antonio Mandini

M. DISEGNO



F099A000015

"DESCRIZIONE dell'invenzione avente per TITOLO:

"DENDRIMERI POLIPEPTIDICI QUALI TRASPORTATORI UNIMOLECOLARI DI FARMACI E SOSTANZE BIOLOGICAMENTE ATTIVI", a nome di Verdini Antonio, residente in Castrocaro Terme, (FO), Viale

G. Marconi n. 29, di nazionalità italiana, depositata in data 23 luglio 1999.

DEP. 23 LUG. 1999 N. F099A000015 -

RIASSUNTO

Vengono descritti dendrimeri polipeptidici di sintesi la cui struttura è composta da un nucleo centrale polifunzionale da cui si irradiano catene polipeptidiche ramificate ad albero, ciascuna delle quali derivante dalla condensazione a cascata di peptidi corti contenenti un centro di ramificazione. Tre segmenti lineari, almeno due dei quali di lunghezza pressoché identica, si dipartono a loro volta da ciascun centro di ramificazione che coincide con l'atomo di carbonio asimmetrico di un residuo amminoacidico trifunzionale. I canali e le cavità interne, formati dalle ramificazioni ad albero dei dendrimeri, risultano sufficientemente grandi da ospitare molecole di farmaci o sostanze bioattive, il cui rilascio nel sangue o a siti bersaglio prescelti avviene per idrolisi enzimatica del carrier dendrimerico oppure per irraggiamento ultravioletto qualora la struttura dendrimerica contenga legami fotolabili. Oltre all'impiego nella formulazione di vaccini, le applicazioni in campo medico dei dendrimeri polipeptidici sono numerosissime e potenzialmente di grande rilevanza terapeutica, in particolare nel trattamento del cancro, delle infezioni virali, e delle malattie infettive causate da microrganismi patogeni.



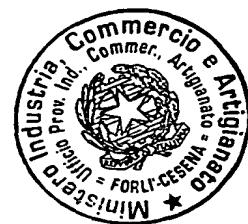
F099 4/000015

TESTO DELLA DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda dendrimeri polipeptidici ed il loro impiego in terapia come trasportatori universali di farmaci e di sostanze biologicamente attive. Le molecole trasportate possono essere sia inglobate che legate covalentemente all'interno dei dendrimeri, oppure anche adsorbite o coniate alla loro superficie.

Con il termine dendrimeri si intende un polimero altamente ramificato costituito chimicamente da un nucleo centrale dal quale si irradia un certo numero di rami primari -monodendron- terminanti con gruppi funzionali da ciascuno dei quali, a loro volta, possono avere origine nuove ramificazioni: tale processo a cascata può continuare sino a che si raggiunge la dimensione desiderata, o fintanto che l'ingombro sterico dei rami più esterni non permette un'ulteriore crescita. Caratteristica comune ai dendrimeri, oltre alla struttura sopra caratterizzata, è l'avere una densità di atomi crescente verso l'esterno o, in termini più adeguati, con la generazione (a parte in prossimità del nucleo). A questo aspetto che li differenzia dalle note molecole polimeriche a stella in cui la massima densità atomica è invece al centro -dal quale si irradiano catene non ramificate- è legata a sua volta la formazione di canali e cavità tra i vari rami (D. A. Tomalia et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1990, 29, 138-175; D. A. Tomalia and H. Dupont Durst, "Topics in Current Chemistry", 1993, 165, 193-313).

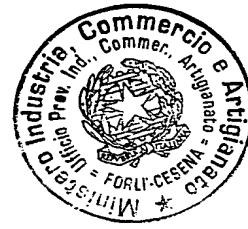
Lo studio delle caratteristiche geometriche di dendrimeri poliammidoamminici, descritto nei riferimenti precedenti, mostra in che modo il numero e la dimensione delle cavità siano funzione a) del numero (N_c) di gruppi funzionali del nucleo, b) del grado di ramificazione (N_b) dei propagatori o celle di

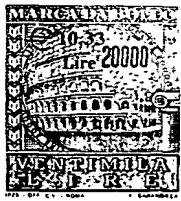


W

ramificazione, c) delle dimensioni e della rigidità di quest'ultime. In particolare, con $N_C=3$ o 4, $N_B=2$ e quando i segmenti costituenti i propagatori sono sufficientemente rigidi, si ha la formazione di un grande numero di cavità, di dimensioni decrescenti verso l'esterno, confrontabile con il cubo della lunghezza del propagatore. Tale proprietà può essere sfruttata per creare complessi con molecole ospite anche di grandi dimensioni. Un altro aspetto degno di nota è che, anche iniziando da un nucleo centrale con geometria priva di simmetrie tridimensionali, al crescere del numero delle generazioni si raggiungono forme dapprima a tazza o ellisoidiche, poi sensibilmente sferiche. Questo effetto sulla struttura è favorito dalla repulsione tra i terminali, in particolare se elettricamente carichi. Gli studi citati in precedenza hanno anche evidenziato come la stessa simmetria chimica sia condizione sufficiente affinché non si abbia il collasso della struttura, anche se propagatori corti e molto flessibili possono dare dendrimeri poco stabili. Nei dendrimeri polipeptidici, le singole ramificazioni irradiantesi dal nucleo centrale polifunzionale verso l'esterno, derivano dalla condensazione a cascata di corte unità peptidiche contenenti almeno un centro di ramificazione -propagatori peptidici o celle di ramificazione peptidiche-. Per la sintesi dei dendrimeri, sono state proposte tanto una via "divergente", in cui la macromolecola cresce uniformemente a partire dal nucleo centrale per successiva addizione a cascata dei rami, generazione dopo generazione, quanto la via "convergente", in cui singoli alberi preformati fino alla generazione desiderata vengono innestati sul nucleo centrale nello stadio finale della sintesi.

Secondo quanto riportato da Tomalia e colleghi, attraverso la scelta del nucleo centrale, del propagatore, del tipo di reazione e del relativo grado di





completezza, si riesce a controllare la forma, la grandezza, la topologia, la flessibilità e la chimica della superficie dei dendrimeri. Le opportunità di usare i dendrimeri per creare complessi con molecole ospiti è stata notata immediatamente dagli autori citati in precedenza; come è evidente, la varietà di molecole dendrimeriche immaginabili è così ampia che si possono pensare complessi ed inclusioni in numero praticamente infinito. Le molecole ospiti possono essere legate covalentemente all'interno o all'esterno del dendrimero, oppure venire semplicemente incluse per diffusione o durante la costruzione stessa del dendrimero e trattenute per maggiore affinità rispetto all'ambiente esterno. Tomalia e colleghi hanno riportato uno studio preliminare sulla possibilità di fare sequestrare 10-20 molecole di dopamina da parte di un dendrimero "Starburst" a base poliammidoamminica sviluppato fino alla generazione 6. Meijer e colleghi hanno sintetizzato le cosiddette "scatole dendritiche", basate sulla costruzione di un guscio chirale di Boc-fenilalanina sui 64 gruppi terminali NH₂ di un dendrimero polipropilenimminico di generazione 6 , all'interno delle quali le molecole ospiti vengono catturate quando la coniugazione covalente di Boc-fenilalanina avviene in presenza delle stesse molecole ospiti. La diffusione dalle "scatole dendritiche" delle molecole inglobate verso l'esterno risulta tanto lenta da essere praticamente trascurabile e solo l'eliminazione dei gruppi protettori Boc del guscio determina l'apertura di "pori" di dimensioni tali da permettere la fuoriuscita per diffusione delle molecole inglobate (J. F. G. A. Jansen et al., Science, 1994, 266, 1226-1229). I dendrimeri di Tomalia e Meijer non posseggono però le caratteristiche comunemente ritenute indispensabili per un eventuale loro sviluppo come trasportatori di farmaci:



1) poter ospitare un ragionevole numero di molecole grandi " a piacere" (quanto cioè le proteine globulari di 100 e più residui) o, in proporzione, rilevanti quantità di molecole più piccole, quali ad esempio peptidi, oligosaccaridi, nucleotidi ed oligonucleotidi;

2) poter scegliere i gruppi alla superficie e le ramificazioni in modo da calibrare sia la solubilità, sia la resistenza agli enzimi, sia anche la labilità all'irraggiamento ultravioletto, per ottenere il rilascio controllato nonché il veicolamento mirato di farmaci o altre molecole-ospiti verso recettori bersaglio specifici, superando barriere cellulari e macroscopiche;

3) la completa biocompatibilità, sia in termini di non-tossicità che di digeribilità o biodegradabilità fisiologica;

4) poter costruire lo scheletro in modo da indurre prima e controllare poi il rilascio delle molecole intrappolate con metodi blandi, fisiologicamente compatibili;

5) poter preparare dendrimeri con dimensioni controllate, preferibilmente nell'intervallo da 5 a 300 nanometri, in modo da evitare il più possibile l'intercettazione da parte del sistema reticolo-endoteliale ed una rapida "clearance" urinaria.

Io ho ritenuto che dendrimeri con scheletro polipeptidico potessero avere le caratteristiche sopra elencate. Nei dendrimeri polipeptidici progettati, singole catene polipeptidiche ramificate ad albero (monodendron), derivanti dalla condensazione a cascata di corte unità peptidiche contenenti almeno un centro di ramificazione (propagatori o celle di ramificazione) si irradiano verso l'esterno da un nucleo centrale polifunzionale, di natura peptidica o non peptidica. In precedenza, nella letteratura scientifica e brevettuale erano

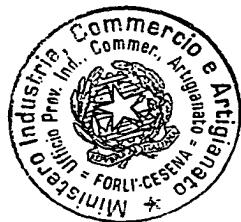


MM

state riportate alcune sintesi di polipeptidi ramificati, prevalentemente monodendron, per l'utilizzazione in studi strutturali o come supporti multifunzionali di antigeni peptidici (vedi riferimenti citati in precedenza). In nessun caso era stata proposta, né tantomeno adombbrata, la possibilità di preparare

per sintesi chimica carriers dendrimerici polipeptidici con strutture sferoidali simili alle poliammidoammine di Tomalia, probabilmente a causa della scarsa solubilità in acqua di monodendron con scheletro di soli residui lisinici. Io ho sorprendentemente trovato come sia relativamente facile preparare dendrimeri polipeptidici coniugando monodendron polipeptidici, costituiti da propagatori peptidici corti ($Nb=2$) il cui centro di ramificazione è il carbonio asimmetrico di un residuo amminoacidico trifunzionale, ad un nucleo centrale polivalente ($Nc=2,3$ o 4) oppure ad un dendrimero preformato. Altrettanto sorprendentemente ho trovato che, pur utilizzando propagatori peptidici alquanto flessibili e con lunghezze non esattamente eguali dei due rami dipartentisi dallo stelo, è possibile ottenere, col crescere delle generazioni, forme a tazza e forme sferoidali. I dendrimeri polipeptidici con alto numero di generazioni (forme sferoidali) non solo inglobano molecole-ospiti con ampio spettro di pesi molecolari, ma dimostrano anche una sorprendente solubilità in acqua, che resta inalterata anche se gruppi polari della superficie, quali NH_2 , OH e COOH , vengono esterificati od acilati con residui apolari.

Con riferimento ai punti 1-5 sopra riportati, per evitare una scelta totalmente empirica del nucleo centrale e del propagatore, ho fatto ricorso ad uno studio teorico di prefattibilità, nell'ambito del quale sono state inizialmente calcolate le strutture di minima energia conformazionale di serie di monodendron



MM

polipeptidici, costruiti con propagatori a forma di Y, con $N_b=2$ e contenenti un numero crescente di generazioni, sino a ricavare la struttura limite con i terminali forzati in posizione di stretta prossimità. Successivamente, dopo aver innestato i monodendron su centri tri- e tetra funzionali ($N_c=3$ e 4), ho di nuovo calcolato le energie conformazionali minime dei dendrimeri risultanti, individuando quelli con strutture-limite sferoidali. Tra i tanti propagatori peptidici possibili, sono stati scelti per lo studio teorico semplici propagatori quali H-Gly-Orn-Gly-Gly-Gly-OH (I) e H-Gly-Orn-Gly-Gly-OH (II), nell'ipotesi che, per le loro ridotte dimensioni e flessibilità, potessero dare tuttavia origine a dendrimeri con strutture abbastanza ampie - con al proprio interno cavità in grado di accogliere molecole di farmaci - caratterizzate da confini esterni definiti ed il più possibile compatti. Il problema della geometria più opportuna per (I) e (II) è stato affrontato sistematicamente valutando le interazioni tra le varie ramificazioni in funzione dell'ampiezza di alcuni angoli diedri scelti. Nel propagatore (I), i quattro residui di glicina C-terminali e quello della glicina N-terminale sono state fissati con tutti gli angoli diedri in conformazione anti, mentre per il residuo di ornitina sono stati studiati gli angoli diedri ϕ (C-C α -N-C), τ , variante di ψ , (O-C-C α -H,), α_1 (C-C α -C₁-C₂) ed α_2 (C α -C₁-C₂-C₃).

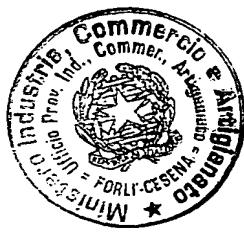
Sono stati individuati, per gli angoli diedri scelti, i seguenti valori: $\tau=240^\circ$; $\phi=60^\circ, 210^\circ, 300^\circ$; $\alpha_1=150^\circ, 210^\circ$; $\alpha_2=120^\circ, 210^\circ, 300^\circ$ e si sono esaminate tutte le loro possibili combinazioni. La conformazione monodendrimerica energeticamente migliore tra quelle considerate è quella con gli angoli $\tau=240^\circ$; $\phi=210^\circ$; $\alpha_1=150^\circ$ ed $\alpha_2=210^\circ$. La disposizione spaziale dei rami è regolare, e soltanto alla generazione 8 iniziano a



MM



verificarsi i primi contatti tra le propaggini dei rami (l'energia di Van der Waals sale a 10^8 Kcal/mole). Per il propagatore (II), la conformazione monodendrimerica energeticamente migliore è quella con gli angoli $\tau=240^\circ$; $\phi=210^\circ$; $\alpha_1=150^\circ$ ed $\alpha_2=300^\circ$. Questo tipo di struttura è stato sviluppato fino al limite di generazione 9, alla quale si ha elevata energia dovuta a contatti tra le estremità dei rami. I monodendron 1 di generazione 7 e 6 sono stati innestati successivamente sui nuclei a ramificazione ternaria N-(CH₂-CH₂-NH₂)₃ e quaternaria C-(CH₂-CH₂-NH₂)₄. Nel dendrimero con centro a ramificazione ternaria l'energia di Van der Waals della generazione 7 è risultata di 15.000 Kcal/mole: quindi, assenza di forti interazioni con i monodendron disposti prevalentemente in posizione equatoriale. La struttura risultante del dendrimero è simile ad una "scodella" con distanza tra centro e bordi di 140-150 Å. I monodendron non riescono a richiudere lo spazio intorno al centro del dendrimero ed anche se sfere di 50 Å di diametro possono essere comodamente ospitate nella struttura, non si può tuttavia parlare della formazione di vere e proprie cavità interne al dendrimero. Con monodendron di generazione 6 innestati nel centro a ramificazione quaternaria, l'energia di Van der Waals del dendrimero risultante è bassa (9.690 Kcal/mole), i monodendron mantengono le direzioni stabilite dalla simmetria tetraedrica del centro e la struttura risultante, pur non essendo completamente richiusa sul centro, e pur assomigliando ancora ad una grande scodella, può ospitare una proteina con peso molecolare maggiore di 20.000 Da, quale l'adenilato chinasi. Il monodendron (II) è stato innestato anch'esso sui nuclei centrali visti in precedenza e, sia per il centro ternario che per quello quaternario, la generazione limite dei dendimeri si raggiunge



con il monodendron di generazione 7. Rispetto ai dendrimeri visti in precedenza, l'occupazione dello spazio periferico è molto più denso e si nota la formazione di una struttura sferoidale con cavità interne e con distanze tra centro del dendrimero ed atomi di idrogeno terminale dell'ordine di 100 Å.

I dati teorici raccolti indicano che entrambe i propagatori non hanno problemi di ingombro sterico nelle vicinanze del nucleo centrale del dendrimero; inoltre, anche per i dendrimeri di natura polipeptidica, confermano l'esistenza di strutture-limite sferoidali dotate di periferie di terminali tanto dense da non permettere l'ulteriore formazione di generazioni complete (P. G. de Gennes and H. J. Hervet, Phys. Lett., 1983, 44, 351-361).

Sulla base sia delle indicazioni strutturali, pur approssimate, ricavate dallo studio teorico di prefattibilità, che delle caratteristiche dei carriers elencate ai punti 1-5, un primo obiettivo della presente invenzione è allora quello di fornire trasportatori polipeptidici a struttura dendrimerica, di forma sferoidale e dimensioni precisamente definite (carriers dendimerici unimolecolari), solubili in acqua, nei cui canali e cavità interne possano essere ospitate molecole di farmaci e di sostanze bioattive, con un ampio spettro di pesi molecolari (sino a qualche decina di migliaia di Da). Un secondo obiettivo della presente invenzione è quello di fornire carriers polipeptidici dendimerici, contenenti al loro interno molecole-ospiti, di dimensioni e superfici tali che, eludendo sia la cattura da parte del sistema reticolo-endoteliale che la rapida eliminazione urinaria, possano rilasciare il loro carico nel sangue o in siti bersaglio prescelti a seguito di una graduale demolizione del loro scheletro per idrolisi enzimatica od irraggiamento ultravioletto. Un ulteriore obiettivo della presente invenzione è quello di



AVV

fornire trasportatori dendrimerici polipeptidici la cui demolizione in vivo avvenga o per idrolisi enzimatica, regolabile e modulabile mediante l'introduzione di residui amminoacidici a configurazione D nello scheletro dendrimerico, oppure per irraggiamento ultravioletto (cateteri con fibre ottiche) dei dendrimeri pervenuti ai siti bersaglio prescelti qualora legami chimici fotolabili siano stati inseriti nella loro struttura.

Costituisce ancora un obiettivo della presente invenzione la sintesi di trasportatori dendrimerici polipeptidici alla cui superficie siano legati covalentemente antigeni di natura peptidica, oligonucleotidica, saccaridica ed oligosaccaridica, derivati da agenti patogeni di interesse. Un ulteriore scopo della presente invenzione è l'uso di detti coniugati nella preparazione di vaccini sintetici. Costituisce infine un obiettivo della presente invenzione la coniugazione covalente ai gruppi superficiali dei dendrimeri polipeptidici di residui capaci di indirizzare i dendrimeri stessi ai siti bersaglio prescelti, quali acido folico, acido sialico, mannosio, anticorpi monoclonali, residui di acidi grassi, vitamine, ormoni e peptidi corti riproducenti le sequenze di riconoscimento di legandi di recettori importanti ed infine di oligonucleotidi capaci di interazioni sito-specifiche con sequenze bersaglio di acidi nucleici.

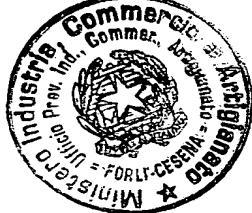
Gli obiettivi sopra elencati vengono raggiunti secondo la presente invenzione mediante strategie di sintesi -divergente, convergente e miste- analoghe a quelle adottate nella preparazione di dendrimeri non polipeptidici, e tattiche di sintesi scelte ed adattate in funzione della struttura chimica dei nuclei centrali e dei propagatori, nonché delle proprietà chimiche e strutturali delle molecole ospiti.



✓

L'obiettivo dell'inglobamento di molecole con peso molecolare superiore a circa 1.000 Da viene realizzato in due stadi: 1) la sintesi preliminare in fase solida di opportuni monodendron secondo la strategia divergente, utilizzando tattiche di sintesi, reagenti e condizioni note agli esperti di sintesi di peptidi e 2) la successiva condensazione in fase acquosa dei monodendron al nucleo centrale del dendrimero in presenza delle molecole ospiti, utilizzando i metodi applicati nella sintesi di proteine e note agli esperti come metodi di "chemical ligation" (P.Lloyd-Williams, F. Albericio e E. Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", 1997, CRC Press, Boca Raton, 175-200).

L'obiettivo dell'inglobamento di molecole con peso molecolare inferiore a circa 1.000 Da viene realizzato o secondo la stessa strategia oppure mediante la preparazione preliminare di carriers "vuoti" che vengono successivamente riempiti per diffusione delle molecole-ospiti nelle loro cavità. L'obiettivo della preparazione di dendimeri polipeptidici con legami fotolabili viene realizzato secondo i metodi sopra riportati, utilizzando monodendron nella cui struttura alcuni residui amminoacidici siano stati sostituiti da residui contenenti legami fotolabili, ma tali da non perturbarne la simmetria. L'obiettivo di preparare trasportatori polipeptidici contenenti molecole ospiti legate covalentemente al loro interno viene realizzato in due stadi: 1) inglobamento delle molecole ospiti o durante lo stadio finale di coniugazione covalente dei monodendron al nucleo centrale polivalente oppure per diffusione in un dendrimero "vuoto" preformato; e 2) aggancio covalente delle molecole-ospiti ad opportuni gruppi funzionali presenti nelle cavità interne dei dendimeri (le catene laterali di residui amminoacidici



W



trifunzionali e loro derivati) secondo reazioni di condensazione specifiche, note agli esperti di sintesi di peptidi. Infine, l'obiettivo della preparazione di dendrimeri polipeptidici con molecole legate in superficie viene realizzato coniugando parte dei gruppi terminali del dendrimero a tali molecole in modo da non modificarne grossolanamente la struttura, soprattutto quando siano state scelte per la veicolazione mirata del carrier ai loro recettori cellulari.

In accordo con la presente invenzione è stata determinata la stabilità dei dendrimeri polipeptidici sia all'idrolisi enzimatica che all'irraggiamento ultravioletto, utilizzando carriers vuoti o contenenti molecole-ospiti. In accordo con la presente invenzione sono state determinate tanto l'immunogenicità dei dendrimeri vuoti in topi da laboratorio (capacità di indurre la produzione di anticorpi e di stimolare la proliferazione in vitro di linfociti T) che le proprietà immunoadiuvanti di dendrimeri polipeptidici con antigeni assorbiti o coniugati covalentemente ai gruppi funzionali della superficie.

Di seguito vengono forniti esempi che dimostrano per i dendrimeri polipeptidici: 1) la fattibilità della sintesi chimica; 2) la capacità di inglobamento di farmaci e molecole bioattive; 3) il rilascio delle molecole-ospiti per idrolisi enzimatica od irraggiamento ultravioletto in vitro ed in vivo; 4) le proprietà immunoadiuvanti e 5) l'assenza di immunogenicità in animali da esperimento. Tali esempi non vanno in alcun modo intesi come limitanti l'ambito dell'invenzione ed ulteriori modifiche, sia dei metodi di sintesi che della preparazione dei complessi "dendrimero polipeptidico-molecola ospite", sono comprese nello scopo e nello spirito della presente invenzione.



A handwritten signature is written across the bottom right area, consisting of several stylized, slanted lines.

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio di Reicher-Kofler. Il potere rotatorio è stato determinato con polarimetro Perkin Elmer 241. Le analisi HPLC sono state effettuate con un apparecchio Bruker LC21-C con rivelatore UV Bruker LC313. I composti sono stati cromatografati su colonna Pico Tag Waters, utilizzando due sistemi eluenti: A) 10% (v/v) di acetonitrile in acqua e B) 60% (v/v) di acetonitrile in acqua, entrambi contenenti 0,1% di TFA, filtrati e degassati prima dell'uso. Le analisi sono state condotte utilizzando due tipi di gradiente lineare: (I) da 0 a 100% di soluzione B in 25 min e (II) da 50 a 100% di soluzione B in 25 min, ad un flusso di 1 ml/min con monitoraggio a 220 nm. La purificazione dei peptidi mediante HPLC preparativo è stata effettuata con un apparecchio Waters Delta Prep 3000 su colonna Delta Pack C18-300Å (30 mm × 30 cm, diametro delle particelle 15 μ). Gli eluenti e le condizioni di eluizione impiegati sono gli stessi utilizzati per le determinazioni analitiche. Il flusso utilizzato è di 30 mm/min con monitoraggio a 220 nm. La cromatografia su strato sottile è stata condotta su piastre di gel di silice F 254(Merck), usando il sistema eluente: 1-butanolo/acido acetico/acqua (3:1:1). Una soluzione di 1% di ninidrina in etanolo e reattivo al Cloro-Iodio sono stati impiegati come reattivi di identificazione. Gli spettri ¹H NMR sono stati registrati con uno strumento Bruker (200 MHz FT).

ESEMPIO 1

Questo esempio illustra la sintesi di un dendrimero polipeptidico di generazione 4 ottenuto per condensazione in soluzione di un derivato di un mono-



dendron di generazione 4 preparato in fase solida ad un centro triammminico simmetrico.

1. Sintesi di N[CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH₂]₃·4HCl

1,91 g di Boc-Phe-OH (7,2 mmoli), 150 µl di N(CH₂-CH₂-NH₂)₃ (2 mmoli), 1,43 g di WSC·HCl (7,5 mmoli), 1,15 g di HOBt (7,5 mmoli) e 560 µl di trietilammina (4,0 mmoli) vengono discolti in 10 ml di DMF anidra a 0 °C e tenuti successivamente sotto agitazione per 24 h a temperatura ambiente. Dopo evaporazione della DMF, il prodotto risultante è stato sciolto in 100 ml di etile acetato, ed estratto con 5% NaHCO₃ (3×20 ml) e brine (3×20 ml). La soluzione organica, dopo acidificazione, viene evaporata ed il prodotto risultante, sciolto in 20 ml di etile acetato, è stato ulteriormente trattato con 50 ml di etile acetato ed HCl 4N a 0°C. La miscela viene lasciata ad agitare a temperatura ambiente per 30 minuti. Evaporato il solvente, il residuo viene ripreso in 20 ml di metanolo e precipitato con etere etilico ed etere di petrolio (1/1). Il solido ottenuto per filtrazione viene ripetutamente lavato con la stessa miscela di eteri. P.f.: 167 °C; [α]_D²² -1.8 (c1, DMF); R.f.: 0,5; HPLC: 8,97 min, gradiente (I); MS: 589 Da, 611 Da, 627 Da, corrispondenti, rispettivamente, a M-H⁺, M-Na⁺, M-K⁺.

2. Sintesi di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH

Ad una soluzione di 3,92 g di H-Gly-Gly-OH (29,7 mmoli) in 45 ml di 5% NaHCO₃ e 100 ml di DMF, sotto agitazione a 0°C, viene addizionata una soluzione di 14,9 g di Boc-Orn(Fmoc)-OSu (27 mmoli) in 30 ml di DMF. Si lascia reagire per 1 h a 0°C e per una notte a temperatura ambiente. Dopo



evaporazione della DMF, il residuo è ripreso con 150 ml di acido citrico 10% ed il prodotto estratto con 200 ml di etile acetato. La fase organica viene trattata con brine, seccata su Na_2SO_4 , filtrata e concentrata. Il prodotto ottenuto viene precipitato con etere etilico in presenza di 2 ml di metanolo.

Resa, 13,9 g. P.f.: 125-128°C; R.f.: 0,7 in 1-butanolo/acido acetico/acqua (3:1:1); HPLC: 19,25 min, gradiente (I).

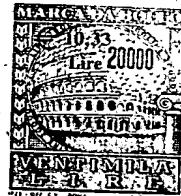
13,9 g di Boc-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH vengono trattati con 20 ml di TFA per 1 h a temperatura ambiente e, dopo evaporazione del TFA, il residuo è triturato con etere etilico e seccato. Si ottengono 14,5 g di TFA-H-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH (24,8 mmoli) che vengono sciolti in 50 ml di 5% NaHCO_3 e 150 ml di DMF a 0 °C. Si aggiungono alla soluzione 8,78 g di Fmoc-Gly-OSu (22,3 mmoli) e si lascia reagire per 1 h a 0 °C e per una notte a temperatura ambiente. Dopo evaporazione della DMF, il residuo è trattato con 10% acido citrico, filtrato e lavato più volte con acqua. Il prodotto ottenuto viene cristallizzato caldo-freddo da acetato di etile. Resa: 14 g; P.f.: 208-210 °C; R.f.: 0,63; HPLC, 23,68 min, gradiente (I); $[\alpha]_D^{22-20}$ ($c=1$ DMF).

NMR (DMSO) δ ppm: 1,32-1,8, m 4H; 2,92-3,06, m 2H; 3,65-3,79, m 6H; 4,18-4,36, m 7H; 7,31-7,9, m 18H; 7,98, d 1H; 8,1, t 1H; 8,25, t 1H; 12,5, bs 1H. MS: 748 Da.

3. Sintesi di ${}_2[{}_2[{}_2[\text{Ac-Gly-Orn(Ac)-Gly-Gly}] \text{Gly-Orn-Gly-Gly}] \text{Gly-Orn-Gly-Gly-OH}$.

La sintesi è stata interamente realizzata su sintetizzatore Milligen 9050, utilizzando una colonna da 0,5 cm I.D. con altezza regolabile, caricata con 0,5



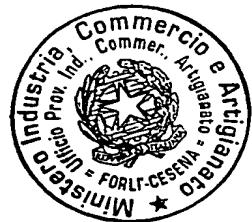


g di resina Fmoc-Gly-PEG-PS (Millipore) con grado di sostituzione 0,18 mmoli/g.

1º ciclo di sintesi: a) deprotezione: 20% piperidina in DMF, 4 min, flusso 8,1 mm/min; b) lavaggio: DMF, 10 min, flusso 4,0 ml/min; c) coupling: 134 mg di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH, 68 mg HBTU e 28 mg di HOBr sono sciolti manualmente in 0,6 ml di N-metilmorfolina 0,6M in DMF+0,4 ml di DMF e quindi caricati in colonna con protocollo automatico. Ricircolazione 5 h, flusso 8,1 ml/min; d) lavaggio: DMF, 15 min, flusso 4,0 ml/min.

2º ciclo di sintesi. Sono stati utilizzati per lo stadio di coupling 268 mg di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH, 136 mg di HBTU e 56 mg di HOBr sciolti in 1,2 ml di N-metilmorfolina 0,6 M in DMF+0,3 ml di DMF. Un piccolo campione di resina è stato prelevato dalla colonna, deprotetto con piperidina 20% in DMF, seccato accuratamente e trattato con TFA/acqua 95/5 per 1h a temperatura ambiente. L'analisi HPLC ha rivelato la presenza di un singolo picco a 2,8 min, gradiente (I).

3º ciclo di sintesi. Sono stati utilizzati due accoppiamenti, utilizzando nel primo, 400 mg di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH, 208 mg di HBTU, 80 mg di HOBr sciolti in 1,8 ml di N-metilmorfolina 0,6 M in DMF+0,2 ml di DMF e 3 lavaggi consecutivi con, nell'ordine, DMF (20 min, flusso 4,0 ml/min), diclorometano (10 min, flusso 9,0 ml/min) e DMF (5 min, flusso 4,0 ml/min); nel secondo, sono stati utilizzati 200 mg di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH, 104 mg di HBTU e 40 mg di HOBr sciolti in 0,9 ml M-metilmorfolina 0,6 M in DMF+ 0,1 ml di DMF con ricircolo di 3 h ad un flusso di 8,1 ml/min e tre lavaggi consecutivi con DMF e diclorometano come in precedenza. Un piccolo campione di resina prelevato dalla colonna



WW

è stato analizzato come in precedenza, rilevando anch'esso un picco unico HPLC a 6,3 min, gradiente (II).

4º ciclo di sintesi. Sono stati effettuati due accoppiamenti utilizzando nel primo 800 mg di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH, 416 mg di HBTU, 160

mg di HOBr sciolti in 3,6 ml di N-metilmorfolina 0,6 M in DMF+ 0,4 ml di DMF con ricircolo di 3,5 h e flusso di 8,1 ml/min; dopo 3 lavaggi consecutivi con, nell'ordine, DMF, diclorometano e DMF, nel secondo accoppamento sono stati utilizzati 400 mg di Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH, 208 mg di HBTU ed 80 mg di HOBr sciolti in 1,8 ml di N-metilmorfolina 0,6 M in DMF con ricircolo di 5 h e flusso di 8,1 ml/min. La resina è stata lavata come in precedenza ed analizzata prelevando un piccolo campione dalla colonna. Picco HPLC unico ma largo centrato a 8,1 min, gradiente (II). La resina è stata successivamente trattata con 20% piperidina in DMF per 10 min. ad un flusso di 8,1 ml/min, lavata con DMF per 15 min ad un flusso di 4,0 ml/min. ed acetilata con 1 M anidride acetica + 1 M N-metilmorfolina in DMF per 1 h ad un flusso di 8,1 ml/min. La resina è stata successivamente estratta dalla colonna, lavata in sequenza con DMF, metanolo, diclorometano ed etere etilico e seccata sottovuoto per una notte. Il monodendron peptidico assemblato sulla resina è stato distaccato dalla stessa sospendendo la resina in un palloncino contenente 15 ml di TFA/acqua 95/5 (v/v) per 1 h a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Dopo filtrazione la resina è stata lavata con 1 ml di TFA ed i filtrati riuniti, dopo concentrazione sottovuoto, sono stati trattati con etere freddo per precipitare il monodendron polipeptidico. La sospensione è stata mantenuta a -20 °C per circa 3 h e successivamente il prodotto è stato filtrato su membrana, ridisciolto in



acqua e liofilizzato 3 volte. Resa: mg 420. L'analisi HPLC rivelava la presenza di un singolo picco largo a 8,1 min, gradiente (I) e qualche traccia di picchi relativi ai prodotti del secondo e terzo ciclo. Il prodotto è stato purificato mediante filtrazione su Sephadex G-50, utilizzando come eluente 50% acido acetico in acqua. Le frazioni raccolte contenenti il prodotto desiderato, dopo diluizione con acqua, sono state liofilizzate due volte per una resa complessiva di 350 mg. MS: 5.021 Da (Teorico, 5.022 Da).

4) Sintesi di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn(Ac)GlyAc]₂]₂]₂}₃

7,33 mg di N[CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH₂]₃·4HCl (0,01 mmoli), 200,1 mg di monodendron polipeptidico acetilato sintetizzato come in 3) (0,04 mmoli), 9,6 mg di WSC·HCL (0,5 mmoli), 7,7 mg di HOBt (0,5 mmoli) e 5,6 µl di trietilammina (0,04 mmoli) vengono sciolti in 15 ml di DMF, trattati con trietilammina sino a pH apparente basico, e lasciati reagire per 48 h a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Evaporata la DMF, il residuo viene ripreso con metiletilchetone (10 ml) e la soluzione risultante estratta con 5% NaHCO₃ (3×10 ml) e brine (3×10 ml), acidificata con 0,1 M HCl e seccata su Na₂SO₄. Dopo evaporazione del solvente organico, il residuo viene lavato ripetutamente con etere etilico, seccato sotto vuoto, ridisciolto in 50% acido acetico in acqua e purificato mediante cromatografia di esclusione su Sephadex G-50 come in precedenza. Resa di prodotto liofilizzato: 161 mg; MS: 15.605 Da (Teorico, 15.602 Da). Il prodotto è stato ulteriormente caratterizzato mediante cromatografia HPLC di esclusione utilizzando una colonna Pharmacia Superdex 75HR10/30 (fase



stazionaria agarosio-destrano reticolati, 13 µm) usando come tampone eluente 50 mM NaH₂PO₄ e 100 mM Na₂SO₄, pH 6,5, flusso 0,5 ml/min e monitoraggio a 220 nm. Picco a 18 min. Il picco della Ribonucleasi (PM=13.400 Da) compare a 25 min., mentre quelli dell'Albumina di siero bovino monomero (66.000 Da) e dimero (112.000 Da) appaiono, rispettivamente, a 20 e 18 min. Tali dati indicano che il dendrimero acetilato di generazione 4 è aggregato nel tampone utilizzato per la cromatografia.

ESEMPIO 2

Questo esempio illustra la sintesi di un dendrimero polipeptidico di generazione 4 ottenuto interamente in fase liquida, in tre stadi successivi. Nel primo stadio, su un centro triamminico simmetrico viene condensato un monodendron polipeptidico di generazione 2 con i gruppi amminici terminali protetti da un residuo acidolabile. Nel secondo stadio, dopo trattamento acido, ai gruppi amminici terminali del dendrimero di generazione 2 viene nuovamente condensato il monodendron di generazione 2 per ottenere il dendrimero di generazione 4. Nel terzo stadio, vengono acetilati esaurientemente i gruppi amminici terminali del dendrimero dopo sblocco acido dei gruppi protettori.

1) Sintesi di Z-Orn(Boc)-Gly-Gly-OCH₃

10,44 g di Z-Orn(Boc)-OH (28,5 mmoli), 5,75 g di WSC·HCl (30 mmoli), 4,59 g di HOBr (30 mmoli), 5,47 g di HCl·H-Gly-Gly-OCH₃ (30 mmoli), e 5,6 ml di trietilammina (40 mmoli) vengono sciolti in 90 ml di DMF, trattati con trietilammina sino a pH apparente basico e quindi lasciati a reagire per





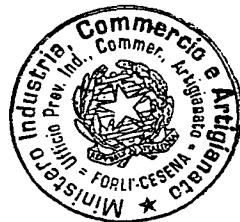
12 h a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Dopo evaporazione della DMF, il residuo viene ripreso con 300 ml di etile acetato e lavato con 0,1 M HCl/brine 1/2 (3×40 ml), 5% NaHCO₃/brine 2/1 (5×40 ml) e ancora brine (30 ml). La soluzione risultante viene acidificata con 0,1 M HCl e seccata su Na₂SO₄. Evaporato il solvente organico fin quasi a completezza, il prodotto viene recuperato per lenta cristallizzazione da etere etilico/etere di petrolio 1/1. Resa: 13,7 g. Picco HPLC a 18,2 min, gradiente (I).

2) Sintesi di Boc-Gly-Orn(Boc)-Gly-Gly-OH

13 g di Z-Orn(Boc)-Gly-Gly-OCH₃ sono sciolti in 170 ml di metanolo e trattati con 750 mg di 10% C/Pd. L'idrogenazione viene continuata per due ore a temperatura ambiente e dopo filtrazione del solido la soluzione risultante viene concentrata e cristallizzata lentamente da etere etilico/etere di petrolio 1/1. Resa: 9,7 g.

8,83 g di H-Orn(Boc)-Gly-Gly-OCH₃ (24,5 mmoli), 6,26 g di Boc-Gly-OSu (23 mmoli) vengono dissciolti in 30 ml di DMF. 10 mmoli di trietilammina vengono aggiunte dopo 7 h a 0°C. Si lascia a reagire ulteriormente per 24 h. Dopo evaporazione di DMF e aggiunta di 300 ml di etile acetato, la soluzione risultante viene estratta con 1 M HCl/brine 1/2 (3×30 ml), 5% NaHCO₃/brine 1/1 (3×30 ml) e brine (2×30 ml). La soluzione è acidificata con 1 M HCl, evaporata e cristallizzata da etere etilico. Resa: 11,8 g. Picco HPLC a 15,5 min, gradiente (I).

5,18 g di Boc-Gly-Orn(Boc)-Gly-Gly-OCH₃ (10 mmoli) vengono trattati con 1 M NaOH in metanolo (50 ml) per 15 h a temperatura ambiente. Dopo evaporazione dell'alcool, il solido residuo viene sciolto in 200 ml di etile



W

acetato ed estratto con 30 ml di 1 M HCl saturato con NaCl e con brine (2 x 20 ml). Dopo acidificazione, la soluzione viene evaporata e cristallizzata da etere etilico/etere di petrolio 1/1. Resa, quantitativa. Picco HPLC a 14,48 min, gradiente (I). MS: 527 Da, 543 Da, 565 Da corrispondenti rispettivamente a M-Na⁺, M-K⁺, M-K⁺-Na⁺ (Teorico 504 Da).

3) Sintesi di [Boc-Gly-Orn(Boc)-Gly-Gly]₂-Gly-Orn-Gly-Gly-OH

4,03 g di Boc-Gly-Orn(Boc)-Gly-Gly-OH (8,0 mmoli), 1,48 g di HCl·H-Gly-Orn(HCl)-Gly-Gly-OCH₃ (3,8 mmoli), 1,69 g di WSC·HCl (8,8 mmoli), 1,35 g di HOEt (8,8 mmoli) e 1,12 ml di trietilammina (8,0 mmoli) vengono sciolti in 30 ml di DMF a 0°C. La reazione viene quindi lasciata per circa 15 h a temperatura ambiente sotto agitazione. Evaporata la DMF, il residuo viene dissolto in 200 ml di metiletilchetone e la soluzione estratta con 1 M HCl/brine 1/1 (4 x 20 ml), 5% NaHCO₃ (3 x 20 ml) e brine (3 x 20 ml). Dopo acidificazione con 1 M HCl, la soluzione è evaporata ed il prodotto risultante cristallizzato da etile acetato/etere etilico 1/4. Dopo 3 lavaggi con etere etilico sono stati ottenuti ca. 4 g di prodotto estere metilico. 3,97 g del prodotto ottenuto in precedenza vengono sciolti in 50 ml di metanolo caldo, quindi la soluzione è lasciata ad equilibrarsi a temperatura ambiente e trattata con 4 ml di 1 M NaOH per 16 h. Evaporato l'alcool, il residuo viene dissolto in 200 ml di metiletilchetone. Dopo aggiunta di 10 ml di 1 M HCl e 20 ml di brine, la soluzione viene estratta accuratamente e neutralizzata con brine (3 x 30 ml). Lo strato organico viene amidrificato con Na₂SO₄, filtrato ed evaporato; il prodotto risultante viene cristallizzato da etilacetato e lavato 3 volte con etere etilico. Resa: 3,7 g. Picco HPLC a



19,14 min, gradiente (I). MS: 1.298 Da e 1314 Da corrispondenti a M-Na⁺ e M-K⁺ (Teorico: 1.275 Da).

4) Sintesi di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn(Boc)-Gly-Boc]₂}₃

510 mg di [Boc-Gly-Orn(Boc)-Gly-Gly]₂-Gly-Orn-Gly-Gly-OH (0,4 mmoli), 73,3 mg di N[CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH₂]₃·HCl (0,1 mmoli), 96,0 mg di WSC·HCl (0,5 mmoli), 77 mg di HOBt (0,5 mmoli) e 56 µl di trietilammina vengono dissolti in 20 ml di DMF a temperatura ambiente. Alla soluzione viene aggiunta trietilammina sino a pH apparente basico, lasciando poi a reagire per 48 h sotto agitazione. Nel corso della reazione si nota la formazione di un precipitato. Evaporata la DMF, il residuo viene ripreso con 100 ml di metiletilchetone e al soluzione organica estratta con 0,5% NaHCO₃ (3 × 20 ml) e brine (3 × 20 ml). Dopo acidificazione con 1 M HCl, la soluzione organica viene essiccata su Na₂ SO₄, filtrata e tirata a secco per ottenere un residuo bianco pulvulento che viene ripetutamente lavato con etere etilico. Resa: 450 mg. HPLC: picco a 22,69 min, gradiente (I). MS: 4.359 Da e 4,381 Da corrispondenti a M-H⁺ e M-Na⁺ (teorico 4.355 Da).

5) Sintesi di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn(Ac)-Gly-Ac]₂]₂]₂}₃

436 mg di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn(Boc)-Gly-Boc]₂}₃ (0,1 mmoli) vengono sciolti in 2 ml di DMSO a caldo. Alla soluzione lasciata a raffreddare sino ad equilibrarsi a temperatura ambiente, vengono aggiunti 15 ml di 4 M HCl in diossano, lasciando poi a



WW

reagire per 1 h sotto agitazione. Il cloridrato, che precipita quasi istantaneamente, viene triturato ed isolato per centrifugazione. Dopo 2 lavaggi con etilacetato, il prodotto viene seccato sotto vuoto in presenza di anidride fosforica. Il prodotto risulta molto igroscopico.

363 mg di prodotto, (0,1 mmoli) vengono sciolti in 2 ml di acqua, neutralizzati con 0,1 M NaOH e aggiunti direttamente a 5 ml di una soluzione in DMF contenente 1,53 g [Boc-Gly-Orn(Boc)-Gly-Gly]₂-Gly-Orn-Gly-Gly-OH (1,2 mmoli), 250 mg di WSC-HCl (1,3 mmoli), 200 mg di HOEt (1,3 mmoli) e 210 µl di trietilammina (1,5 mmoli). La soluzione risultante viene lasciata a reagire per 48 h a temperatura ambiente sotto agitazione. Evaporata la DMF, il residuo viene ripreso con 50 ml di metiletilchetone e la soluzione risultante viene estratta con 5% NaHCO₃ (3 x 20 ml) e brine (3 x 20 ml). Dopo acidificazione con 1 M HCl, la soluzione viene essiccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata. Il residuo ottenuto viene lavato ripetutamente con etere etilico e, dopo essiccazione sotto vuoto, viene sciolto in 20 ml di TFA/acqua 98/2 e lasciato a reagire a temperatura ambiente per 2 h sotto agitazione. Dopo evaporazione del solvente, il residuo viene ripetutamente lavato con etere etilico e seccato sotto vuoto.

800 mg del sale trifluoroacetato ottenuti (ca. 3,6 mmoli) vengono sciolti in 10 ml di una miscela di DMF/acqua 1/1 assieme a 905 mg di acetato di p-nitrofenile (5,0 mmoli) e 700 µl di trietilammina (5 mmoli). La soluzione risultante viene tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 50 h. Evaporato il solvente, il residuo viene ripetutamente lavato con etere etilico e seccato sotto vuoto. Resa: g 1,1. Analogamente al dendrimero acetilato di generazione 4 preparato come descritto nell'esempio 1, il prodotto grezzo

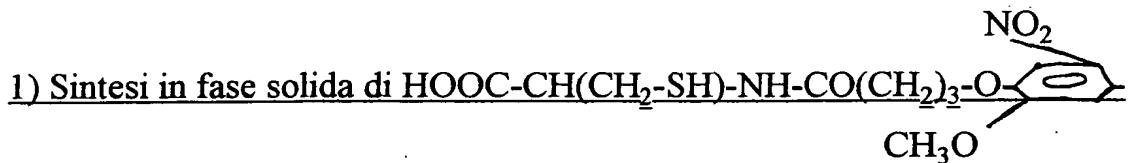




viene purificato mediante cromatografia di esclusione su Sephadex G-50, e le frazioni utili recuperate per liofilizzazione. MS: 15.439 Da (Teorico=15.431 Da). Il peso molecolare del prodotto è stato determinato mediante cromatografia HPLC di esclusione, utilizzando una colonna Pharmacia Superdex 75HR 10/30 come descritto nell'esempio 1. Il tempo di ri-tenzione di 18 min. indica che il prodotto è identico al dendrimero preparato come nell'esempio 1, e che anch'esso aggrega nel tampone eluente.

ESEMPIO 3

Questo esempio descrive la sintesi un dendrimero polipeptidico di generazione 7, contenente residui fotolabili di acido 4-[4-(1-(ammino)etil)-2-metossi-5-nitrofenossi]butanoico.

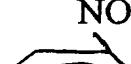


La sintesi è stata condotta interamente utilizzando un sintetizzatore Milligen 9050, una colonna da 0,5 cm I.D. con altezza regolabile caricata con 0,1 g di resina Fmoc-Cys(Trt)-PEG-PS con grado di sostituzione 0,16 mmoli/g. Nel primo ciclo di sintesi l'acido 4-[4-(1-Fmoc-amminoetil)-2-metossi-5-nitrofenossi]butanoico è stato condensato al residuo di cisteina legato alla resina dopo sblocco del gruppo Fmoc con 20% piperidina in DMF. I successivi stadi di sintesi sono stati condotti come descritto nella sintesi del monoden-

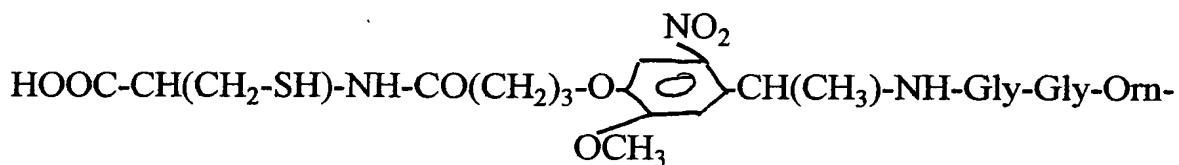


dron acetilato dell'esempio 1, utilizzando lo stesso derivato Fmoc-Gly-Orn(Fmoc)-Gly-Gly-OH e gli stessi reagenti e solventi. Resa: 480 mg. Il prodotto grezzo ottenuto dopo trattamento della resina con TFA/acqua 95/5 è stato purificato mediante cromatografia di esclusione su Sephadex G50, usando acido acetico/acqua 1/1 come eluente. Dopo diluizione con acqua delle frazioni contenenti il prodotto desiderato, il monodendron è stato recuperato mediante 3 liofilizzazioni successive. MS: 41.980 Da (Teorico, 41.972 Da).

2) Sintesi di $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}-\text{CO}-\text{CO})\text{S-CH}_2\text{-CH(COOH)-NH-CO(CH}_2)_3\text{-O-}$

 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-}$
 OCH_3
 $\text{Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-}$
 $\text{Orn(Ac)-Gly-Ac]_2]_2]_2]_2]_3$

3,86 mg di Tris(2-maleimidoetil)ammina(Pierce) (0,01 mmoli) e 4,0 g di



$\text{Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-}$
 $\text{Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn(Ac)-Gly-Ac]_2]_2]_2]_2]_2$ (ca. 0,1 mmoli)
 vengono sciolti in 5 ml di una miscela di DMF/acqua 10/90 a temperatura ambiente e sotto agitazione. Il pH apparente della soluzione viene portato a



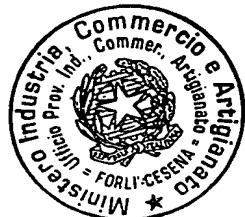
7,0 e la reazione protratta per 3 h. La soluzione viene successivamente trattata con 10 g di resina thiol-Sepharose 4B preventivamente attivata con 2,2'-dipiridildisolfuro. Dopo aver eliminato l'eccesso di monodendron mediante reazione di scambio tiolo-disolfuro in 7 ml di tampone PBS a pH 7,3, la resina viene eliminata per filtrazione ed il filtrato liofilizzato dopo diluizione con acqua. Il prodotto grezzo così ottenuto viene successivamente purificato mediante cromatografia di esclusione su Sephadex G50, utilizzando acido acetico/acqua 1/1 come eluente. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato vengono diluite con acqua e liofilizzate. Resa: 751 mg. MS: 126.309 Da (Teorico, 126.299 Da).

ESEMPIO 4

Questo esempio illustra la stabilità alla idrolisi enzimatica in vitro dei dendrimeri polipeptidici descritti negli esempi 1-3.

La degradazione in vitro è stata condotta con Leucina-amminopeptidasi (E.C. 3.4.11.1), un enzima microsomiale, tipo VI, isolato da rene di maiale, la cui attività era stata preventivamente controllata impiegando come substrato leucina-4-nitroanilide. La concentrazione dei dendrimeri utilizzati era di 1.10^{-3} M in tampone 50 mM Tris.HCl, pH 8.5 con l'aggiunta di 5mM MgCl₂. La concentrazione dell'enzima 3 U/ml. L'incubazione è stata effettuata a 37°C in bagno termostatico oscillante; i prelievi, a vari intervalli di tempo, sono stati bloccati con TFA e centrifugati.

La degradazione in plasma umano eparinato è stata studiata con concentrazioni dei dendrimeri di ca. 1.0 nmoli/ml plasma; le incubazioni sono state effettuate a 37°C ed i prelievi della miscela plasmatica, da 100 µl ciascuno,

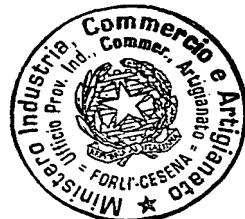


sono stati bloccati a vari intervalli di tempo con 10% TFA e centrifugati a 10.000 x g , 5 min. La degradazione plasmatica è stata seguita mediante HPLC, usando una colonna Lichrosorb RP 18 (10 μ m), un chromatografo Waters mod. 660, un rivelatore Jasco Uvidec-100-II nelle seguenti condizioni: eluente A, acqua 100%+0.1% TFA; eluente B, acetonitrile 100%+0.1% TFA da 0% B a 21% B in 23 min e monitoraggio a 220 nm. Dai profili degradativi ottenuti, la percentuale di degradazione è stata calcolata rapportando l'area dei segnali registrati ai vari tempi con quella al tempo zero. I risultati raccolti dimostrano che il dendrimero polipeptidico di generazione 4 e con i gruppi terminali amminici liberi viene degradato con tempo di dimezzamento di ca. 12 h da parte di Leucinamminopeptidasi e di circa 8 h dal plasma umano. I dendimeri di generazione 4 e 7 con i terminali amminici acetilati sono risultati più resistenti alla degradazione enzimatica sia con l'enzima isolato (tempo di dimezzamento 23 h), che in plasma umano (tempo di dimezzamento 16 h).

ESEMPIO 5

Questo esempio illustra l'intrappolamento per diffusione dell'inibitore dell'Encefalinas L-Trp-L-Ala in un dendrimero polipeptidico di generazione 6 preparato come nell'Esempio 1 ed il successivo rilascio graduale nel tempo.

A 2 ml di una soluzione acquosa di 8 mg di L-Trp-L-Ala vengono aggiunti 30 mg di dendrimero di generazione 6 con i gruppi amminici terminali liberi.



MV



Dopo 24 h, la soluzione viene precipitata sotto agitazione con 15 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene centrifugato, lavato ripetutamente con etanolo anidro e seccato in stufa da vuoto in presenza di anidride fosforica. Resa: 20 mg. Una aliquota di 10 mg del prodotto isolato viene sciolta in 10 ml di acqua distillata e la soluzione introdotta in una "Slide-A-Lyzer Dialyzer Cassette" (Pierce) da 3-15 ml e con "cut-off" di 10.000 Da. La dialisi viene condotta contro 100 ml di acqua distillata, per 48 h e sotto lenta agitazione, determinando ogni 30 min l'assorbanza a 280 nm di aliquote di 200 µl di soluzione diluite sino ad un volume finale di 1 ml. Valori crescenti di assorbanza sino a ca. 12 h di dialisi, hanno indicato per il dipeptide un rilascio graduale nel tempo, per diffusione lenta dall'interno del dendrimero. Il valore di assorbanza della soluzione esterna alla cassetta da dialisi è risultato pressochè eguale a quello di una soluzione acquosa di riferimento preparata sciogliendo 10 mg di dipeptide in 110 ml di acqua.

ESEMPIO 6

Questo esempio illustra: 1) l'intrappolamento di eparina in un dendrimero polipeptidico di generazione 7 contenente legami fotolabili, durante lo stadio finale di condensazione ad un centro trifunzionale simmetrico delle molecole di monodendron in presenza di eparina e 2) il rilascio di eparina a seguito dell'irraggiamento ultravioletto del dendrimero "carico".

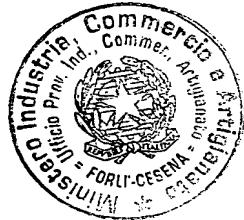
1. Agli stessi reagenti impiegati nell'esempio 3.2 per la sintesi del dendrimero di generazione 7 vengono aggiunti 1,12 g di sale sodico di eparina ottenuta per depolimerizzazione di eparina isolati da mucosa intestinale ovina (P.M. ca.2.500 Da) con attività di ca.180 IU/mg. Dopo aver fissato il pH



✓

apparente a 7.0, la reazione è stata protratta per 3 h a temperatura ambiente. L'eccesso di polipeptide dendrimerico è stato eliminato con resina thiol-Sephadex 4B preventivamente attivata con 2,2'-dipiridildisolfuro. Dopo filtrazione della resina, il filtrato viene caricato in una colonna di Sephadex G-75 condizionata in acqua ed eluito con acqua ad un flusso di 0.5 ml/min in modo da separare dal dendrimero l'eparina in eccesso. Le frazioni contenenti il dendrimero sono state successivamente liofilizzate, ottenendo una resa di 1.04 g.

2. 750 mg di dendrimero "caricato" con eparina vengono sciolti in 6 ml di acqua distillata ed irradiati per 600 min a 360 nm in una ampolla di quarzo. In seguito, 1 ml di soluzione viene iniettato intravena a ciascuno di 6 ratti maschi di peso corporeo di ca. 600g lasciati a digiuno per 12 h prima dell'inizio dell'esperimento (Ratti 3-8). A ciascuno di altri 6 ratti maschi di eguale peso (atti 9-14) viene iniettato 1 ml della soluzione ottenuta sciogliendo altri 750 mg di dendrimero in 6 ml di acqua distillata, ma non irradiata a 360 nm. Un ratto non viene trattato (Ratto 1), mentre un secondo ratto (Ratto 2) riceve un'iniezione intravena di 250 mg di eparina sciolta in 1 ml di acqua distillata. L'effetto dell'eparina viene determinato con il test AP- TT (Activated-Partial Thromboplastin Test) che misura il tempo necessario per un campione di siero prelevato dalla vena caudale di formare un coagulo di fibrina. I risultati sono riportati nella tabella seguente:



Ratto	Trattamento con eparina	Tempo di coagulazione in secondi					
		t=0	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
1	Nessuno	25	26	25	-	-	-
2	iv	27	54	>300	-	-	-
3	Dendrimero irradiato	25	53	>300	-	-	-
4	id	26	57	>300	-	-	-
5	id	25	54	>300	-	-	-
6	id	24	56	>300	-	-	-
7	id	26	55	>300	-	-	-
8	id	27	54	>300	-	-	-
9	Dendrimero non irradiato	27	36	85	130	260	28
10	id	26	39	91	149	252	26
11	id	25	34	90	141	257	28
12	id	26	37	89	153	260	29
13	id	25	40	94	160	268	28
14	id	26	38	89	156	259	25

Dopo iniezione del dendrimero irradiato, i ratti 3-8 avevano tempi di coagulo entro due ore quasi identici a quello del ratto 2 al quale era stata iniettata la soluzione di sola eparina. I ratti 9-14, ai quali era stata iniettata la soluzione di dendrimero non irradiata, mostravano un aumento crescente dei tempi di coaugulo, a partire dalla prima ora sino alla quarta ora, alla quale il tempo di coaugulo è di poco inferiore a quello osservato nel ratto 2 dopo 2 h dall'iniezione di eparina; il tempo di coaugulo per questo gruppo di ratti



A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. V."

rientra nella norma dopo 24 h. Questi risultati dimostrano: a) che l'eparina viene intrappolata nel dendrimero nella fase finale della sintesi, durante la quale i monodendron sono coniugati covalentemente al nucleo centrale; b) che l'irraggiamento per 600 min a 360 nm determina una lisi del residuo fotolabile incorporato nella struttura del dendrimero, con conseguente completa fuoriuscita dell'eparina dal trasportatore e c) che il dendrimero non irradiato rilascia gradualmente nel tempo l'eparina in esso intrappolata a causa della progressiva demolizione della sua struttura da parte degli enzimi del sangue.

ESEMPIO 7

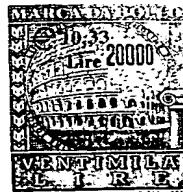
In questo esempio vengono riportate: 1) l'assenza di immunogenicità del dendrimero di generazione 4 preparato come descritto nell'esempio 2 e 2) le proprietà adiuvanti dello stesso dendrimero con alcuni gruppi amminici terminali coniugati covalentemente all'antigene Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro (segmento dell'epitopo immunodominante della proteina circumsporozoitica di *Plasmodium falciparum*).

1) Determinazione dell'immunogenicità di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly-HI₂]I₂]I₂}₃

50 µg di dendrimero sciolti in un volume finale di 50 µl di adiuvante completo di Freund sono stati iniettati alla base della coda di 5 gruppi di topi di ceppo C57/8L/6 (7-10 topi per gruppo). Dopo 3 settimane, sono stati iniettati, con le modalità sopra riportate, 25 µg di dendrimero emulsionati in



MM



25 µl di adiuvante incompleto di Freund (dose di richiamo). 10 giorni dopo l'iniezione di richiamo, è stato prelevato del sangue da ogni topo, mediante puntura del plesso retrorbitale. I sieri sono stati quindi testati in un saggio immunoenzimatico ELISA, rivestendo le pareti dei pozzetti di piastre di polivinilacetato (Falcon, USA) con 100 µl di soluzione 0,2 µM di dendrimero in tampone carbonato, pH 9,6, alla temperatura di 4°C ed incubando per circa 10 h. Dopo 3 lavaggi con tampone fosfato, pH 7,4 e 0,05% Tween-20, i siti scoperti nei pozzetti di plastica sono stati bloccati per incubazione a 37°C, nel corso di 1 h, con 10 mg/ml di albumina di siero bovino in tampone fosfato-Tween-20, e ripetutamente lavati con tampone fosfato-Tween-20. Si è quindi incubato col siero ottenuto dai topi, diluito in tampone fosfato-Tween-20, per 2 h a 37°C. Dopo ripetuti lavaggi con tampone fosfato-Tween-20, si è incubato ancora con anticorpi anti-siero di topo, coniugati all'enzima fosfatasi alcalina, diluiti in tampone fosfato 1/500-1/8.000 per 1-3 h a 37°C. Dopo ripetuti lavaggi con tampone fosfato-Tween-20, si è incubato per 1-3 h a 37°C con p-nitrofenilfosfato (conc. 1mg/ml) in 0,1 M dietanolammina, pH 9,8. Dai valori di densità ottica letti a 405 nm, è risultato che nessun topo ha prodotto anticorpi antidendrimero. Per evitare il rischio, legato alla grande solubilità in acqua del dendrimero, della sua rimozione dalle pareti dei pozzetti durante i ripetuti lavaggi, gli esperimenti sono stati condotti dopo coniugazione covalente del dendrimero a bastoncini di polietilene, preventivamente γ -irradiati in una soluzione acquosa (6% v/v) di acido acrilico secondo quanto descritto da M. Geysen e colleghi in Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1984, 81, 3998-4002. La reazione successiva di condensazione dei gruppi amminici terminali del dendrimero con i gruppi carbossi-



MW

lici dell'acido poliacrilico aggraffato al polietilene, è stata condotta utilizzando diisopropilcarbodiimmide in presenza di HOBr, a temperatura ambiente per circa 24 h. Il saggio per verificare la presenza di anticorpi antidendrimero è stato eseguito immergendo i bastoncini di polietilene nei pozzetti della piastra di microtitolazione, operando come descritto in precedenza. Anche in questo caso, non è stata osservata la presenza di anticorpi antidendrimero.

2) Coniugazione di Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro ai gruppi terminali amminici di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly-H]₂]l₂]₂}₃
 400,6 mg di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly-H]₂]l₂]₂}₃ (ca. 1,8 mmoli) vengono sciolti in 10 ml di DMF assieme a 636 mg di Fmoc-Asn-Ala-Asn-Pro-OH (1,0 mmoli), 192 mg di WSC·HCl (1,0 mmoli), 154 mg di HOBr (1,0 mmoli) e 460 µl di trietilammina. La soluzione, alla quale viene aggiunta ancora trietilammina sino a pH apparente basico, viene tenuta ad agitare per 10 h a temperatura ambiente, e quindi trattata con 218,1 mg di (Boc)₂O (1,0 mmoli) dopo ulteriore aggiunta di 500 µl di trietilammina. La miscela, tenuta sotto agitazione per circa 10 h, viene trattata con 5 ml di piperidina, lasciata agitare per 2 h a temperatura ambiente, e quindi precipitata con 100 ml di etere etilico. Il prodotto ottenuto viene sciolto in 10 ml di acqua distillata e la soluzione risultante filtrata su Sephadex G-50 condizionata in acido acetico/acqua 1/1. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato vengono liofilizzate dopo diluizione con acqua. 400 mg del solido recupe-



rato vengono nuovamente sciolti in 10 ml di DMF e messi a reagire con le stesse quantità di Fmoc-Asn-Ala-Asn-Pro-OH, WSC-HCl, HOBt e trietilammina, nelle stesse condizioni sperimentali. La soluzione è stata trattata con 5 ml di piperidina, tenuta sotto agitazione per altre 2h a temperatura ambiente, ed infine precipitata con ca. 100 ml di etere etilico. Il solido ottenuto (resa: 305 mg) è stato sciolto in 5 ml di TFA/acqua 95/5 e, dopo 1 h di agitazione a temperatura ambiente, precipitato nuovamente in 100 ml di etere etilico e seccato sotto vuoto in presenza di anidride fosforica. Il prodotto grezzo è stato purificato per filtrazione su Sephadex G-50 Superfine, e recuperato per liofilizzazione. Resa. 280 mg.

3) Determinazione delle proprietà immunoadiuvanti di N{CH₂-CH₂-NH-CO-CH(CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Orn(-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn)-Gly-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn]₂]₂]₂}₃.

5 gruppi di topi di ceppo C57/8L/6 (7-10 topi per gruppo) sono stati iniettati ciascuno con 500 µg di dendrimero preparato come in precedenza sciolti in 50 ml di acqua alla base della coda. Altrettanti gruppi di topi dello stesso ceppo sono stati iniettati con 50 µg di Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro sciolti in 50 µl di acqua, alla base della coda. Dopo 3 settimane, con le stesse modalità sopra riportate, sono stati iniettati 25 e 250 µg degli stessi prodotti ai due gruppi di topi in esame. 10 giorni dopo l'iniezione di richiamo è stato prelevato del sangue da ogni topo mediante puntura del plesso retrorbitale. I sieri sono stati quindi saggiati in un saggio immunoenzimatico ELISA che impiega (Asn-Ala-Asn-Pro)₄₀ come antigene, secondo quanto descritto



MM

da G. Del Giudice e colleghi in J. Clin. Microbiol, 1997, 25, 91-96. Il diagramma in cui in ordinata è riportata la densità ottica ed in ascissa la diluizione del siero, mostra che solo il coniugato antigene-dendrimero ha prodotto elevati titoli di anticorpi anti-Asn-Ala-Asn-Pro, con un incremento di ca. 200 volte rispetto ad Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro.



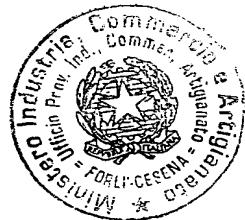
UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA
DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

FORLÌ CESENA

Il Funzionario

M.a Carmen Dradt

23 LUG. 1999



M



RIVENDICAZIONI

1. Una macromolecola peptidica dendrimerica costituita da: i) un nucleo centrale; ii) uno strato superficiale nel quale si addensano le propaggini terminali di catene polipeptidiche ramificate ad albero che formano iii) l'interno della struttura, caratterizzata da cavità e canali vuoti delimitati dalle ramificazioni, a loro volta costituite da una successione a cascata di corte unità peptidiche, eguali o diverse tra loro. Ogni unità peptidica, o propagatore, contiene un residuo amminoacidico trifunzionale il cui atomo di carbonio asimmetrico è il centro di ramificazione del propagatore. Dal centro di ramificazione si dipartono due rami di lunghezza eguale, o pressochè eguale, con gruppi terminali identici, ed un terzo ramo di lunghezza eguale o maggiore dei primi due, con un gruppo terminale diverso dai precedenti. Tale molecola dendrimerica viene rappresentata dalla formula generale (I):



dove K è eguale ad $X-(CH_2)_n-X^1$, con $X=X^1$ oppure X diverso da X^1 , e X, X^1 sono NH, CO, S; oppure K è eguale a $Y[-(CH_2)_n-Z]_i$, dove Y è un atomo di carbonio o di azoto, Z è NH, S, un atomo di alogeno, un residuo maleimidico, n è uguale a 1-6 ed i è uguale a 3,4; oppure K è uguale a $X-CH(R)-CO[-NH-CH(R)-CO]_n-NH-CH(R)-COOR^1$, dove R è uguale a $(CH_2)_m-X^1$, m è uguale a 1-5, R^1 è uguale a metile, etile, butile, isopropile, $X=X^1$ oppure X diverso da X^1 , e X, X^1 ed n hanno il significato visto in



precedenza oppure anche $X=X^1=CO(CH_2)_n-N-CO-$ con n = 2-8;

L è eguale a $-CO-CH(R^2)-(CH_2)_n-NR^3$ dove $R^2=H$ oppure una delle catene laterali degli amminoacidi naturali, loro derivati e loro analoghi di sintesi;



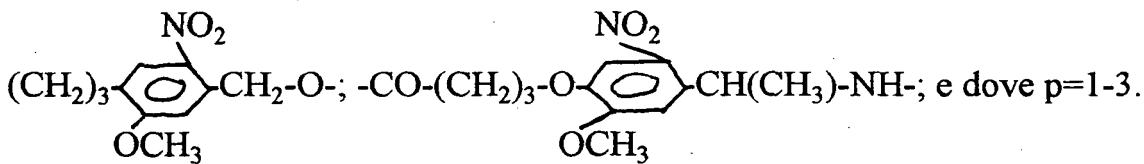
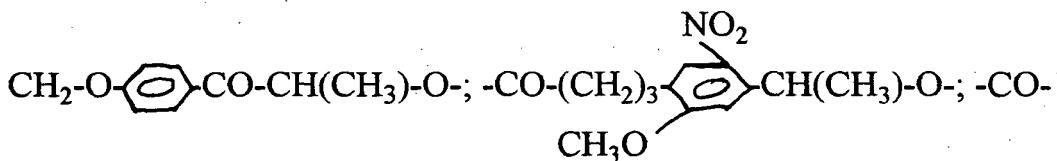
MM

$R^3=H$ oppure una catena alchilica lineare, contenente anche atomi di carbonio sostituiti; $R^2-CH(CH_2)_n-NR^3$ è un anello a 5 o 6 atomi, ed $n=0-6$; oppure L è eguale a $-CO-CH(R^2)-CO-N(R^3)-(CH_2)_m-N(R^3)$ dove R^2 ed R^3 hanno il significato visto in precedenza ed $m=1-6$; oppure L è eguale a $-CO-CH_2-NH-$

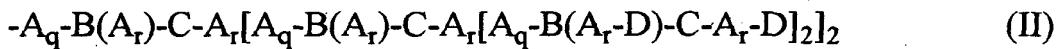
~~$-CO-CH(R^2)-O-$, $-CO-CH_2-O-N-CH-CO-$, $-CO-CH(R^2)-(CH_2)_n-S-$~~

CH_2-CO-W , $-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-W$ e $-CO-N-CH-CO-W$ dove $W=$
 $HO-CH_2-CH-T-CH-Q$

$-N(R^3)-(CH_2)_m-NR^3$, $Q=H$, CH_3 e T è un atomo di ossigeno oppure zolfo, mentre R^2 , R^3 ed m hanno il significato visto in precedenza; oppure L è uno dei residui: $-CO-\text{cyclohexyl}-CH_2-O-$; $-CO-CH_2-\text{cyclohexyl}-CO-CH(CH_3)-O-$; $-CO-$
 NO_2



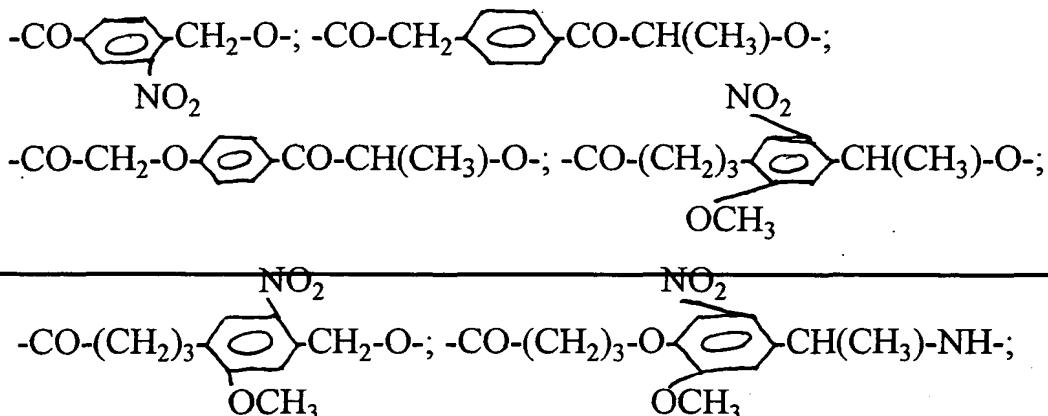
M è eguale al residuo rappresentato dalla formula (II):



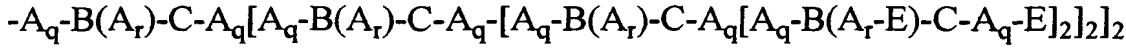
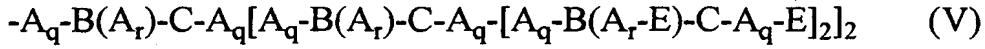
dove A = $-CO-CH(R^2)-(CH_2)_n-NR^3$, con R^3 ed n aventi lo stesso significato visto in precedenza, $q=1-6$, $r=1-4$ ed R^2 , oltre al significato visto in precedenza, è anche uno qualsiasi dei residui amminoacidici trifunzionali naturali o loro analoghi sintetici; B è il residuo $-CO-CH[-(CH_2)_n-X^1]-X$, con X e X^1 che, eguali o diversi tra loro, sono NH, CO, S ed n=1-5; C è eguale ad A oppure a $-CO(CH_2)_n-NH$, $-(CH_2)_n-S$, con n=1-6 ed ai residui



✓



D è un residuo rappresentato dalle formule (III)-(VI):



(VI), nelle quali A, B, C, q ed r hanno il significato visto in precedenza, ed E è rappresentato dalle formule (VII) ed (VIII):



$\text{-A}_q-\text{B(A}_r\text{-C-A}_q[-\text{A}_q-\text{B(A}_r\text{-P)-C-A}_q\text{-P}^1]_2$ (VIII), dove A, B, C, q ed r hanno il significato visto in precedenza, e P, P¹, uguali o diversi tra loro, sono H, alchile lineare o ramificato, acile, amminoacido, peptide, nucleotide, oligonucleotide, saccaride, oligosaccaride, proteina, anticorpo monoclonale, polietilenglicole con 10-400 unità $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ in catena, lipide, enzima, fattore di crescita, agente diagnostico, ligando di metalli. I termini amminoacido, saccaride, peptide, anticorpo, proteina si intendono come comprendenti anche derivati sintetici degli stessi.

2. Dendrimeri polipeptidici della rivendicazione 1 con un diametro molecolare compreso tra 5 e 300 nm e, preferibilmente, tra 10 e 200 nm.



N

3. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H))_2)_2)_2}$.

4. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H))_2)_2)_2)$.

5. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H))_2)_2)_2)_2$.

6. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H))_2)_2)_2)_2$.

7. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H))_2)_2)_2)_2)_2$.

8. I dendimeri delle rivendicazioni 3-7 con i terminali amminici acetilati.

9. Il dendrimero $\text{N}\{\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO-CH(-CH}_2\text{-fenile)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly(H)]_2]_2\}{}_3$





10. Il dendrimero N{-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(-CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly-H]₂]₂]₂]}₃.

11. Il dendrimero N{-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(-CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly-H]₂]₂]₂]₂]}₃.

12. Il dendrimero N{-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(-CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly-H]₂]₂]₂]₂]}₃.

13. Il dendrimero N{-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(-CH₂-fenile)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly-H]₂]₂]₂]₂]₂]}₃.

14. I dendimeri delle rivendicazioni 9-13 con i terminali amminici acetilati.

15. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-NH-CH}[(\text{-CH}_2)_4\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H-Gly-H))_2)_2}]$ -CO-NH-CH[(CH₂)₄-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H-Gly-H))₂)₂]-CO-NH-CH[(CH₂)₄-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H-Gly-H))₂)₂]-COOCH₃.

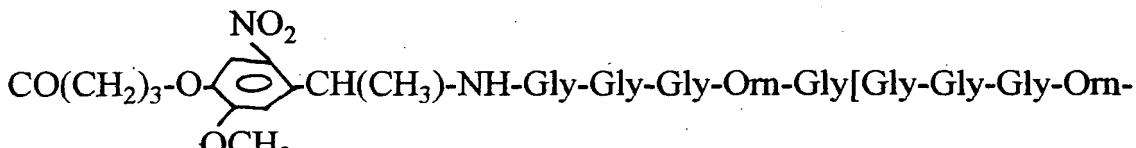
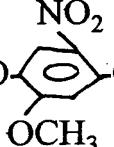
16. Il dendrimero $\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{2}(\text{H-Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly})\text{Gly-Orn-Gly-Gly-NH-CH}[(\text{-CH}_2)_4\text{-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H-Gly-H))_2)_2}]$ -COOCH₃.



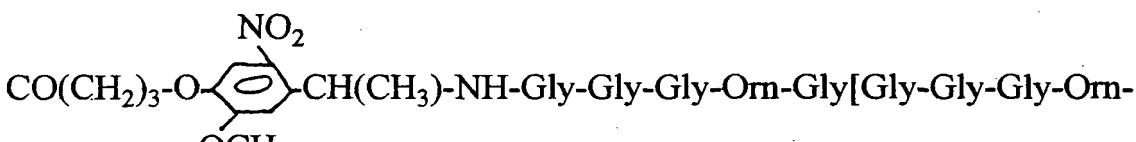
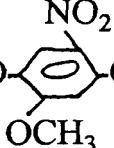
Om-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly-H₂)₂)₂]-CO-NH-CH[(-CH₂)₄-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly-H₂)₂)₂)₂]-CO-NH-CH[(-CH₂)₄-NH-Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(Gly-Gly-Orn-Gly(H₂)₂)₂)₂]-COOCH₃.

17. I dendrimeri delle rivendicazioni 15-16 con i terminali amminici acetilati.

18. Il dendrimero N{-CH₂-CH₂-N-CO-S-CH₂-CH(COOH)-NH-

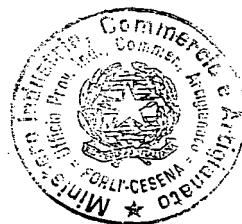

CO(CH₂)₃-O--CH(CH₃)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly-H]2]2]2]2]2]3.

19. Il dendrimero N{-CH₂-CH₂-N-CO-S-CH₂-CH(COOH)-NH-


CO(CH₂)₃-O--CH(CH₃)-NH-Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly[Gly-Gly-Gly-Orn-Gly-H]2]2]2]2]2]3.

20. I dendrimeri delle rivendicazioni 18-19 con i terminali amminici acetilati.

21. I dendrimeri polipeptidici della rivendicazione 1 con almeno una molecola bioattiva legata covalentemente alla loro superficie ed in grado di riconoscere un recettore cellulare.



AM

22. I dendrimeri polipeptidici della rivendicazione 21 in cui la molecola bioattiva legata alla superficie dei dendrimeri è scelta tra amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, oligonucleotidi, lipidi, saccaridi, oligosaccaridi, polisaccaridi e molecole organiche ad attività farmaceutica.

23. I dendrimeri polipeptidici della rivendicazione 22, con inglobato un farmaco o una molecola bioattiva.

24. I dendrimeri della rivendicazione 23 con farmaci anticancro inglobati.

25. I dendrimeri della rivendicazione 23 con antibiotici inglobati.

26. I dendrimeri della rivendicazione 23 con sostanze ad attività antivirale inglobate.

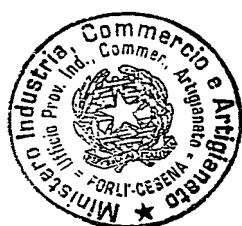
27. Un vaccino per la malaria da Plasmodium falciparum, comprendente una dose efficace di una composizione formata da un antigene della proteina circumsporozoitica inglobato, adsorbito o legato covalentemente alla superficie di un dendrimero polipeptidico in un liquido fisiologicamente compatibile.

28. Un processo per la produzione dei dendrimeri della rivendicazione 1 che consiste nella:

- i) Sintesi di nuclei centrali con almeno due gruppi funzionali primari;
- ii) Sintesi divergente di monodendron in fase solida, con i terminali bloccati da gruppi protettori temporanei o permanenti;
- iii) Condensazione covalente dei monodendron ai nuclei centrali e, se necessario, sblocco finale dei gruppi protettori temporanei.

29. Un processo per la produzione dei dendrimeri della rivendicazione 1 che consiste nella:

- 1) sintesi di nuclei centrali con almeno due gruppi funzionali primari;



A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Mazzoni".

- 2) condensazione covalente a detti nuclei centrali di monodendron di generazione 2 con i terminali bloccati da gruppi protettori temporanei;
- 3) sblocco dei gruppi protettori temporanei dei dendrimeri di generazione 2 ottenuti al punto precedente e condensazione a cascata di propagatori peptidici o di monodendron di generazione 2 ai gruppi terminali dei dendrimeri, sino all'ottenimento di dendrimeri di generazione desiderata;
- 4) rimozione, se necessaria, dei gruppi protettori temporanei dalla superficie del dendrimero.

30. Un metodo di inglobamento per diffusione di farmaci e di sostanze bioattive con pesi molecolari inferiori a 1.000 Da, nei dendrimeri della rivendicazione 1, consistente nell'aggiunta di quantità opportune di dendrimero polipeptidico ad una soluzione concentrata o satura di molecole-ospiti e nella precipitazione, dopo 1-24 h, del complesso "dendrimero polipeptidico-molecola ospite" con un eccesso di non-solvente.

31. Un metodo di inglobamento di farmaci e sostanze bioattive con peso molecolare superiore a 1.000 Da nei dendrimeri della rivendicazione 1, consistente nella coniugazione selettiva, in tampone acquoso, di monodendron preformati al nucleo centrale del dendrimero in presenza della sostanza da inglobare.

32. Un metodo di coniugazione covalente selettiva di farmaci e sostanze bioattive a gruppi funzionali presenti nelle cavità dei dendrimeri della rivendicazione 1, in tampone acquoso, dopo "caricamento" per diffusione secondo il metodo della rivendicazione 30.



A handwritten signature in black ink, likely belonging to the patent examiner or official who processed the application.



33. Un processo per il rilascio in vivo di molecole-ospiti inglobate, consistente nel frammentare la struttura del dendrimero mediante radiazioni elettromagnetiche.

34 Il processo della rivendicazione 33, in cui la radiazione elettromagnetica comprende fotoni con energia sufficiente a rompere i legami fotolabili della struttura del dendrimero.

35. Un metodo per controllare e modulare il grado di idrolisi enzimatica in vivo dei dendrimeri della rivendicazione 1 consistente nella introduzione di residui amminoacidici D nella struttura dello scheletro dendrimerico.

Antonio Verdini

23 luglio 1999



UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA
DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
FORLÌ CESENA

Il Funzionario
M.a Carmen Dradi

23 LUG. 1999

